



Proyecto de Investigación para optar al título de Cirujano Dentista:

**"ANÁLISIS DE LA FIBROSIS INTERSTICIAL EN MUCOSA ORAL NORMAL,
DISPLASIA EPITELIAL ORAL Y CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS"**

Alumnos: Lilaj Yáñez Lagos

Claudio Peralta Rivera

Tutor Responsable: Alejandra Fernández M.

Tutor Asociado 1: Carolina Somarriva

DEDICATORIA

A mis padrinos por creer en mí desde el primer día.

A mis hermanos por nunca dejar caer mis brazos.

A mis abuelos que desde el cielo guiaron mis pasos.

A mi madre que, sin su sacrificio durante su vida, nada de esto podría ser posible.

LYL

A mis Padres y a la Kuka por ser incondicionales y darme todo lo que necesito en esta vida.

CPR

AGRADECIMIENTOS

*A cada uno que confió en mí para lograr mis metas y ser una gran profesional.
A mi tutora Dra. Alejandra Fernández por su gran motivación, en especial en este último año que saco lo mejor de mí.*

LYL

Agradezco a mis Padres, familia, amigos y docentes, por entregarme apoyo siempre que lo necesité.

CPR

Tabla de contenido

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	9
2.1 Hipótesis	9
3. OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo general.....	9
3.2 Objetivos específicos	9
4. MARCO TEÓRICO	10
4.1. Elementos generales de la histología de la mucosa oral normal	10
4.2. Displasia epitelial oral	14
4.3. Carcinoma oral de Células escamosas.....	19
4.4. Fibrosis	23
4.5. Fibroblastos asociados a cáncer.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODO.....	26
5.1. Tipo de Estudio	26
5.2. Muestra	26
5.3 Variables	27
5.4. Técnica de Tinción Tricrómica de Masson	28
5.5. Calibración	29
5.6 Determinación de la fibrosis intersticial	29
5.7. Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS	31
6.1.Descripción de las muestras	31
6. 2. Ilustraciones.....	32
7. DISCUSIÓN	34
8. CONCLUSIONES.....	35
9. REFRENCIAS	36
10. ANEXO.....	40

Índice de Tablas

Tabla I. Clasificación y descripción de la mucosa oral normal.	11
Tabla II. Alteraciones citológicas que puede presentar un DEO.	14
Tabla III. Cambios arquitectónicos que puede presentar una DEO.	15
Tabla IV. Criterios de clasificación de displasia epitelial oral	16
Tabla V. Grado de diferenciación histopatológica del Carcinoma Oral de Células Escamosas	21
Tabla VI. Tabla de Variables.	27
Tabla VII. Descripción de las muestras.	31
Tabla VIII. Comparación de la extensión de fibrosis intersticial en muestras de MON, DEO y COCE.	32

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Mucosa oral	10
Ilustración 2. Epitelio escamoso estratificado queratinizado	12
Ilustración 3. Epitelio escamoso estratificado no queratinizado	13
Ilustración 4. Displasia epitelial leve	17
Ilustración 5. Displasia epitelial moderada	18
Ilustración 6. Displasia epitelial severa	18
Ilustración 7. Carcinoma in Situ	19
Ilustración 8. COCE bien diferenciado	22
Ilustración 9. COCE moderadamente diferenciado	22
Ilustración 10. COCE mal diferenciado	23
Ilustración 11. Mucosa oral normal con extensión +1	32
Ilustración 12. Displasia epitelial leve con extensión +4	33
Ilustración 13. Carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado con extensión de +2	33
Ilustración 14. Carcinoma oral de células escamosas moderadamente diferenciado con extensión +2	34

Índice de Anexos

Anexo 1: Carta de aprobación comité ético-científico UNAB.....	40
Anexo 2: Carta de autorización Servicio de Histopatología UNAB.....	43

RESUMEN

Introducción: El Carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tipo de cáncer más frecuente en la cavidad oral, constituyendo el 90% de la totalidad de neoplasias malignas a nivel bucal. Fibrosis hace relación al depósito excesivo de colágeno y otros componentes de la MEC en un tejido. El microambiente o estroma de un COCE está constituido principalmente por fibroblastos, llegando a constituir incluso el 90% de la extensión de su masa tumoral. Los fibroblastos asociados a cáncer (CAF's) participan en el crecimiento, invasión del tumor local y metástasis, debido a que regulan la formación de la matriz extracelular.

Objetivo: Comparar la extensión de fibrosis intersticial (EFI) en muestras de Mucosa Oral Normal (MON), Displasia Epitelial Oral (DEO) y Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) con tinción de Tricrómico de Masson (TM).

Material y método: Estudio descriptivo. Se analizaron 17 muestras de MON, 15 muestras de DEO y 16 de COCE, teñidas con tricrómico de Masson. Para determinar la extensión de fibrosis intersticial se identificaron las áreas de mayor fibrosis subyacente al epitelio oral normal, displásico y neoplásico maligno. Se clasificó la extensión de la fibrosis intersticial según su proporción en el total de la imagen, siendo 0 (sin fibrosis), +1 (1-25%), +2 (26-50%), +3 (51-75%) y +4 (76-100%). Las variables fueron analizadas mediante el de test Kruskal-Wallis y test post hoc de Dunn's Pairwise.

Resultados: Existe una asociación entre el diagnóstico (MON, DEO y COCE) con la extensión de la fibrosis intersticial ($p < 0.001$). El grupo con diagnóstico de MON difiere en la extensión de la fibrosis intersticial del grupo con diagnóstico

de COCE ($p < 0.001$) y el grupo con diagnóstico de DEO difiere en la extensión de la fibrosis intersticial con el grupo con diagnóstico de COCE ($p < 0.001$). El grupo con diagnóstico de MON no difirió en la extensión de la fibrosis intersticial del grupo con diagnóstico de DEO ($p = 0.371$).

Conclusión: La fibrosis intersticial se presenta en las muestras de MON, DEO y COCE, presentando una mayor extensión a mayor malignidad del diagnóstico.

Palabras claves: Neoplasia oral, microambiente tumoral, fibrosis.

1. INTRODUCCIÓN

El Carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tipo de cáncer más frecuente en la cavidad oral, constituyendo el 90% de la totalidad de neoplasias malignas a nivel bucal. El COCE deriva de la transformación maligna del epitelio escamoso o displásico de la cavidad oral y su etiopatogenia se ha asociado, entre otros, a los cambios que acontecen en su microambiente.(1,2,3,4)El microambiente o estroma de un COCE está constituido principalmente por fibroblastos, llegando a constituir incluso el 90% de la extensión de su masa tumoral, y estos fibroblastos son conocidos como fibroblastos asociados a cáncer o tumor, miofibroblastos o fibroblastos activados, abreviados como CAF's. (5, 6, 7)

Los fibroblastos estromales (CAF's) participan en el crecimiento, invasión del tumor local y metástasis (8), debido a que regulan la formación de la matriz extracelular. Los fibroblastos estromales en las neoplasias malignas se van a encontrar activos, sintetizando factores de crecimiento, provocando un aumento de la síntesis de colágeno tipo I, tenascina, fibronectina, metaloproteínas, entre otros (8). Los CAFs pueden ser identificados mediante anticuerpos contra α -SMA, debido a que α -SMA se expresa en los fibroblastos presentes en tumores de aspecto fibroso. (9)

Es por ese motivo que el presente estudio presenta como objetivo evaluar la extensión de fibrosis intersticial en muestras de Mucosa oral normal (MON), Displasia epitelial oral (DEO) y Carcinoma oral de Células escamosas (COCE) con tinción de Tricrómico de Masson.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La extensión de fibrosis intersticial aumentará progresivamente en las muestras obtenidas de Mucosa Oral Normal, Displasia Epitelial Oral y Carcinoma Oral de Células Escamosas?

2.1 Hipótesis

Nula: Los valores de Extensión de fibrosis intersticial en muestras de MON, DEO y COCE con tinción en TM presentan valores distintos entre ellas.

Alternativa o trabajo: Los valores de Extensión de fibrosis intersticial promedio en muestras con COCE son mayores a las de DEO y respectivamente las de DEO son mayores a las de MON en las tinciones con TM.

El presente estudio no presentará hipótesis ya que es una serie de casos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar la fibrosis intersticial en muestras de Mucosa Oral Normal (MON), Displasia Epitelial Oral (DEO) y Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) con tinción de Tricrómico de Masson (TM).

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las muestras de estudio según sexo, edad, localización y diagnóstico.
- Determinar la extensión de la fibrosis intersticial entre Mucosa oral normal, Displasia epitelial oral y Cáncer oral de células escamosas.

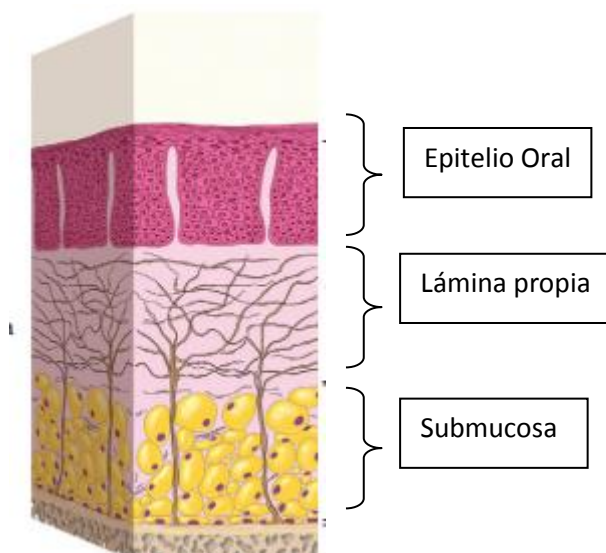
4. MARCO TEÓRICO

4.1. Elementos generales de la histología de la mucosa oral normal

Generalidades

La mucosa oral se encuentra constituida por dos capas de tejidos estructural y embriológicamente diferentes, una capa superficial de origen ectodérmico, conocido como: Epitelio y otra capa subyacente de origen ectomesenquimático, conocido como lámina propia o tejido conectivo, ambas capas se encuentran conectadas a través de la lámina basal. Esta relación está constituida por proyecciones del epitelio hacia la lámina propia que son llamadas crestas epiteliales y también la proyección del tejido conectivo hacia el epitelio oral, llamadas papilas conectivas o papilas coriales.

Ilustración 1. Mucosa oral



Ten Cate's. Oral Histology: Development, structure and function. Nanci, 2008.

Histológicamente, la mucosa oral es clasificada en tres tipos: *Masticatoria*, de *revestimiento* y *especializada*.

Tabla I. Clasificación y descripción de la mucosa oral normal. Componentes de la mucosa oral normal. (10)

TIPO DE MUCOSA	CARACTERISTICAS
Masticatoria Mucosa gingival y paladar duro	Epitelio oral: Escamoso estratificado queratinizado. Estrato queratinizado capa orto o paraqueratina. Estrato granuloso 2 a 3 capas epiteliales, planas, eosinófilas. Estrato espinoso 6 a 8 capas epiteliales, poligonales, ligeramente basófilas. Estrato basal 1 capa epitelial, cúbicas, basófilas. Lámina propia: Tejido fibrovascular.
Revestimiento Mucosa yugal, alveolar, labial, piso de boca, paladar blando y vientre lingual	Epitelio oral: Escamoso estratificado no queratinizado. Estrato superficial 2 a 3 capas de células epiteliales planas, con núcleo, eosinófilo. Estrato intermedio 2 a 3 capas epiteliales, planas, eosinófilas. Estrato espinoso 6 a 8 capas epiteliales, poligonales, ligeramente basófilas. Estrato basal 1 capa epitelial, células cúbicas, basófilas. Lámina propia: Tejido fibroso denso.
Especializada Dorso lingual	Epitelio oral: Escamoso estratificado queratinizado. Con papilas: fungiformes, filiformes y foliadas. Lámina propia: Tejido fibrovascular.

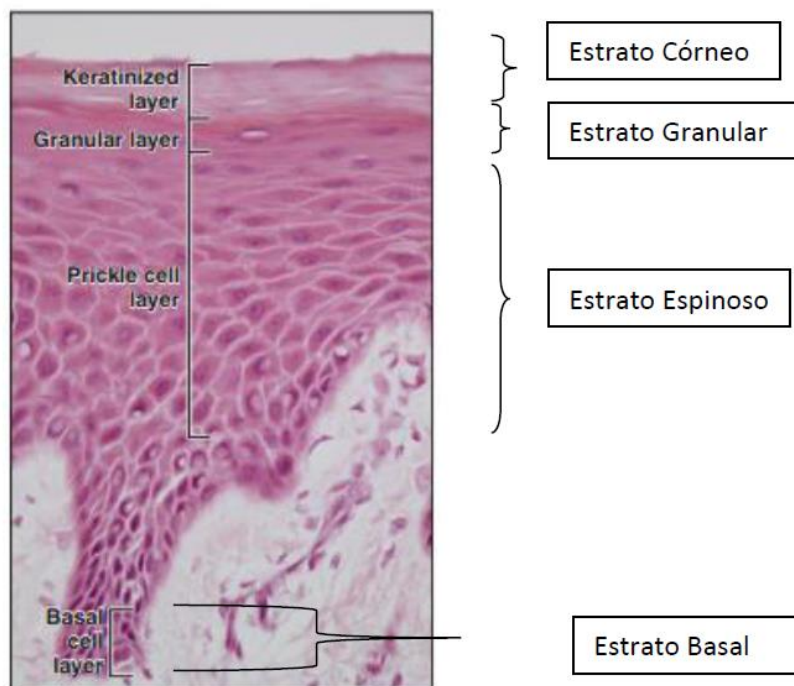
Epitelio

El epitelio puede ser plano o escamoso estratificado, también podemos clasificarlo según la presencia de células queratinocitos como: queratinizado, paraqueratinizado o no queratinizado. Estas células epiteliales se encuentran unidas estrechamente entre sí, formando una barrera funcional de protección entre el medio bucal y el tejido conectivo subyacente (10).

Según la presencia de queratinocitos que integran el epitelio bucal se disponen formando cuatro capas o estratos:

- Basal
- Espinoso
- Granuloso
- Córneo

Ilustración 2. Epitelio escamoso estratificado queratinizado.

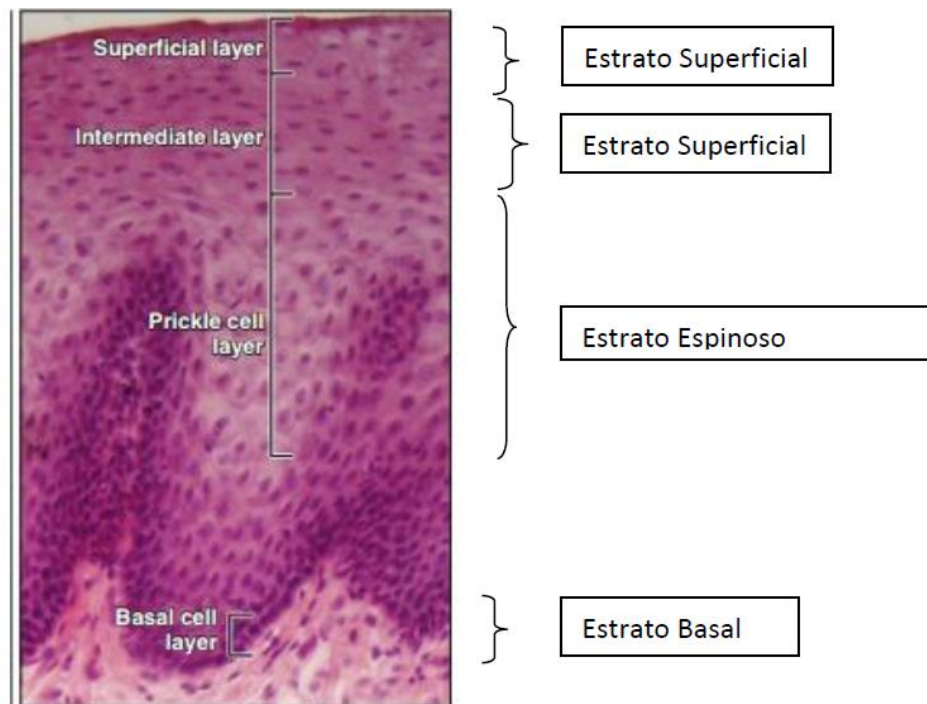


Ten Cate's. Oral Histology: Development, structure and function. Nanci, 2008

Cuando no existe la presencia de queratinocitos, no se produce esta capa superficial córnea y carece además del estrato granuloso, por lo tanto, las capas de un epitelio no queratinizado son:

- Capa basal
- Capa intermedia
- Capa superficial

Ilustración 3. Epitelio escamoso estratificado no queratinizado.



Ten Cate's. Oral Histology: Development, structure and function. Nanci, 2008

Tejido conectivo

El tejido conectivo que soporta el epitelio oral se denomina lámina propia y consta de células, vasos sanguíneos, elementos neurales y fibras confinadas en una sustancia fundamental amorfa. Se puede dividir en dos capas: la papilar superficial (Asociada con las crestas epiteliales) y la capa reticular más profunda (que se encuentra entre la capa papilar y las estructuras subyacentes).

La lámina propia contiene varias células diferentes: fibroblastos, macrófagos, mastocitos y células inflamatorias.

La matriz intercelular de la lámina propia consta de dos tipos principales de fibras: colágeno y elastina, que junto con la fibronectina se entremezclan en una sustancia fundamental compuesta por glicosaminoglicanos y proteínas derivadas del suero. El colágeno presente en la lámina propia es principalmente tipo I y tipo III, se pueden observar colágeno tipo IV y VII en parte de la lámina basal (10)

4.2. Displasia epitelial oral

Generalidades

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la displasia epitelial oral como cambios epiteliales arquitectónicos y citológicos causados por acumulación de cambios genéticos, asociados con un incremento del riesgo para progresar a COCE. (1)

Cambios celulares

Es esencial la identificación de las alteraciones que se pueden observar en las células individuales para determinar el tipo de DEO. En general, las células pueden presentar apariencias similares a la de células de la capa basal, destacando la presencia de núcleos grandes e hipercromáticos, nucléolos prominentes y eosinófilos. La siguiente tabla II muestra las diferentes alteraciones citológicas que puede presentar una DEO (1).

Tabla II. Alteraciones citológicas que puede presentar un DEO.

Alteraciones citológicas que puede presentar un DEO.
1. Variación anormal en el tamaño nuclear.
2. Variación anormal en la forma nuclear.
3. Variación anormal en el tamaño celular.
4. Variación anormal en la forma celular.
5. Aumento en la proporción núcleo/citoplasma.
6. Mitosis atípicas.
7. Aumento del número/tamaño nucléolos.
8. Hipercromatismo.

Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO, 2017.

Cambios arquitectónicos

Las lesiones displásicas pueden mostrar cambios hiperqueratósicos, acantóticos e incluso atrofia. La tabla III nombra las alteraciones estructurales que puede presentar una DEO (1).

Tabla III. Cambios arquitectónicos que puede presentar una DEO.

Cambios arquitectónicos que puede presentar una DEO.
1. Estratificación irregular.
2. Pérdida de polaridad de las células basales.
3. Crestas epiteliales anómalas (en gota, bulbosas)
4. Aumento del número de mitosis.
5. Mitosis anormales superficiales.
6. Queratinización prematura de células aisladas.
7. Perlas de queratina dentro de las crestas.
8. Pérdida de la cohesión epitelial

Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO, 2017.

Criterios de clasificación y graduación histopatológica

El término displasia epitelial agrupa diferentes cambios estructurales del epitelio caracterizado por la combinación variable de fenómenos histológicos indicadores de un desorden de la maduración y proliferación celular, donde la gravedad de la lesión depende de un mayor o menor número de trastornos epiteliales verificados. (12)

Clasificando la gravedad de la displasia en:

- Leve
- Moderado
- Severo

Tabla IV. Criterios de clasificación de displasia epitelial oral.

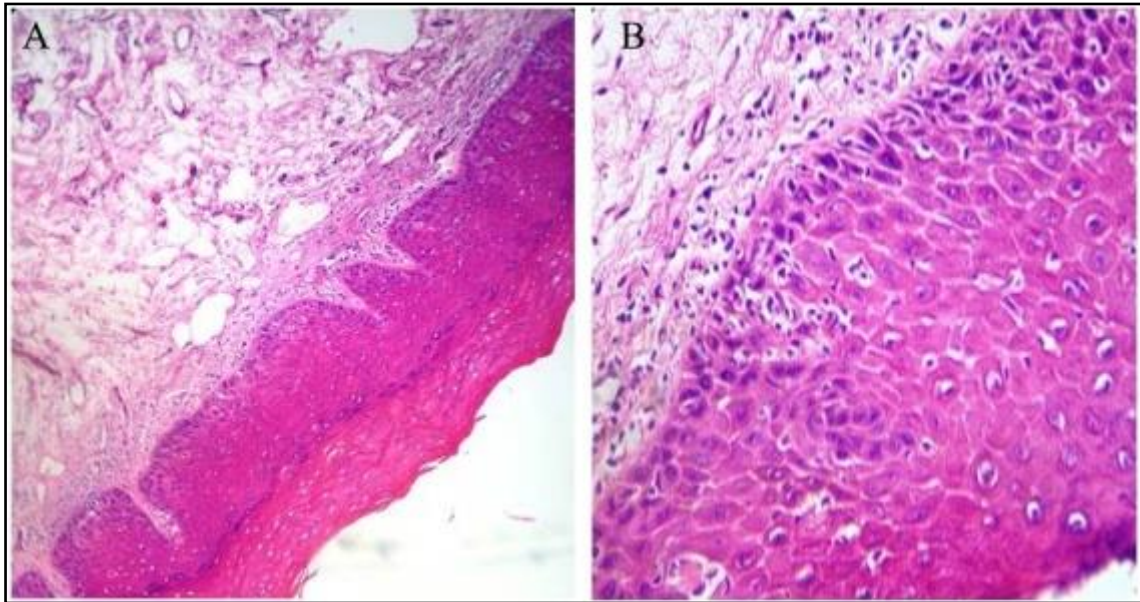
Displasia Leve	
Displasia Moderada	Cambios estructurales se encuentran limitados a los dos tercios basales del epitelio.
Displasia Severa	Cambios estructurales que afectan a más de dos tercios del epitelio, pero sin afectar la totalidad de su espesor.
Carcinoma In Situ	Los cambios afectan a la totalidad, observándose marcadas alteraciones citológicas y estructurales, donde es común observar mitosis superficiales tanto típicas como atípicas.

Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO, 2005.

En la displasia leve los cambios displásicos son mínimos y están confinados al tercio inferior del epitelio. En la displasia moderada los cambios displásicos ocurren en los dos tercios inferiores del epitelio. En la displasia severa los cambios ocupan más de dos tercios, pero no todo el espesor epitelial. (13)

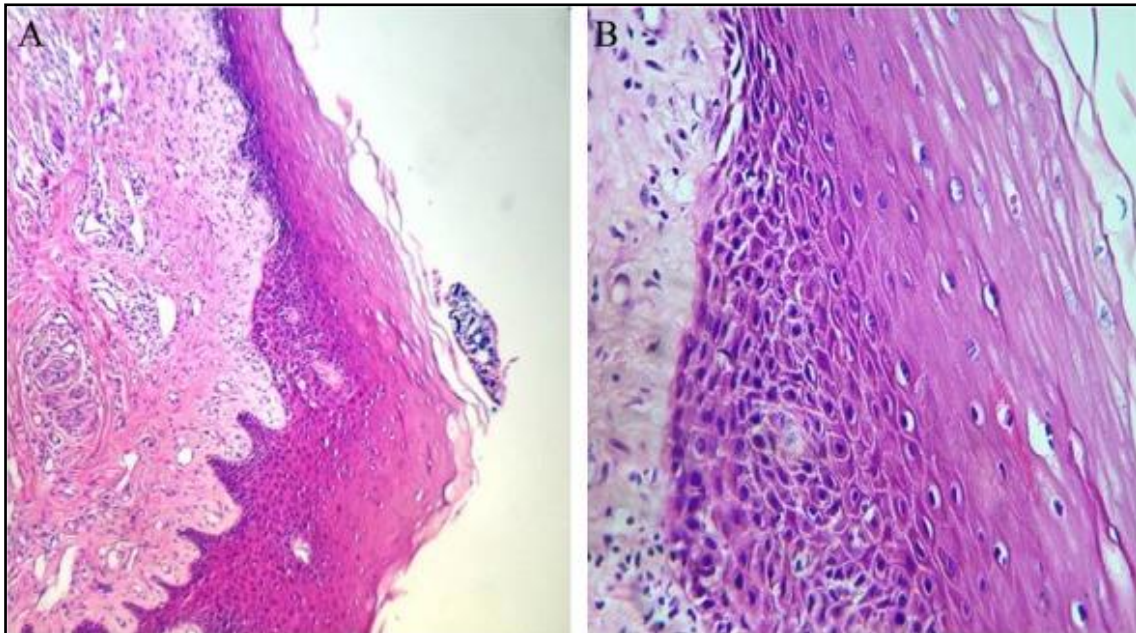
A continuación, se observan ilustraciones de displasia epitelial oral en sus diferentes graduaciones y carcinoma in situ.

Ilustración 4. Displasia epitelial leve con cambios de hiperplasia en la capa basal o parabasal. células con citoplasma basófilo. Hiperqueratosis.



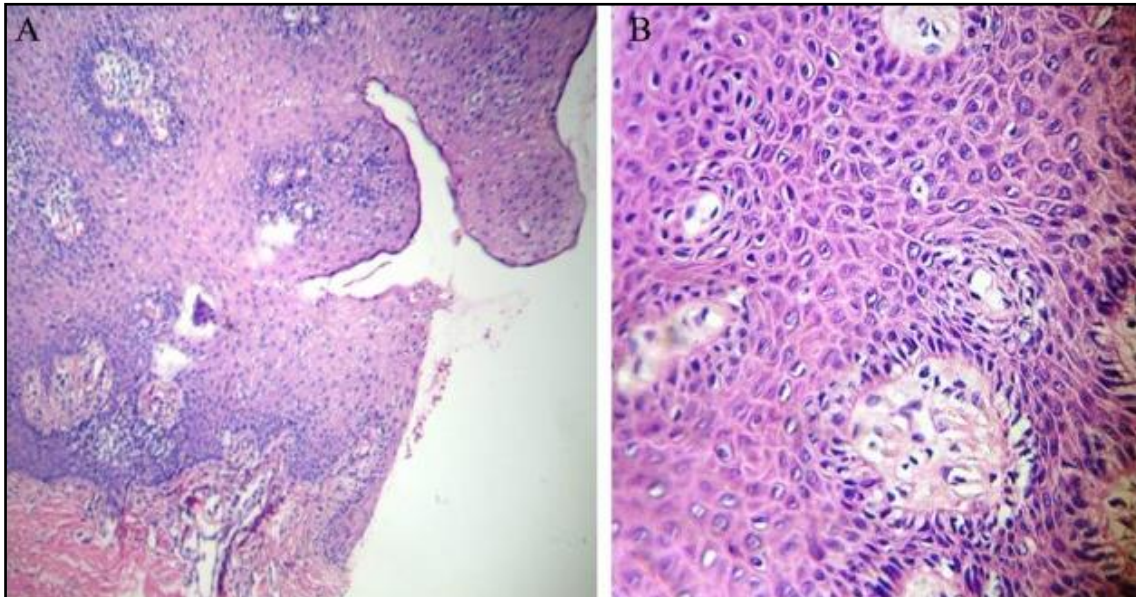
A. Muestra en tinción de Hematoxilina-eosina con aumento x40. **B.** Aumento x100. Epithelial Dysplasia in Oral Cavity. Samaneh Shirani, 2014.

Ilustración 5. Displasia epitelial moderada con presencia de cambios en la capa basal y porción media de la capa granular. Epitelio hiperplásico, papilas en forma de gota, núcleos hipercromáticos.



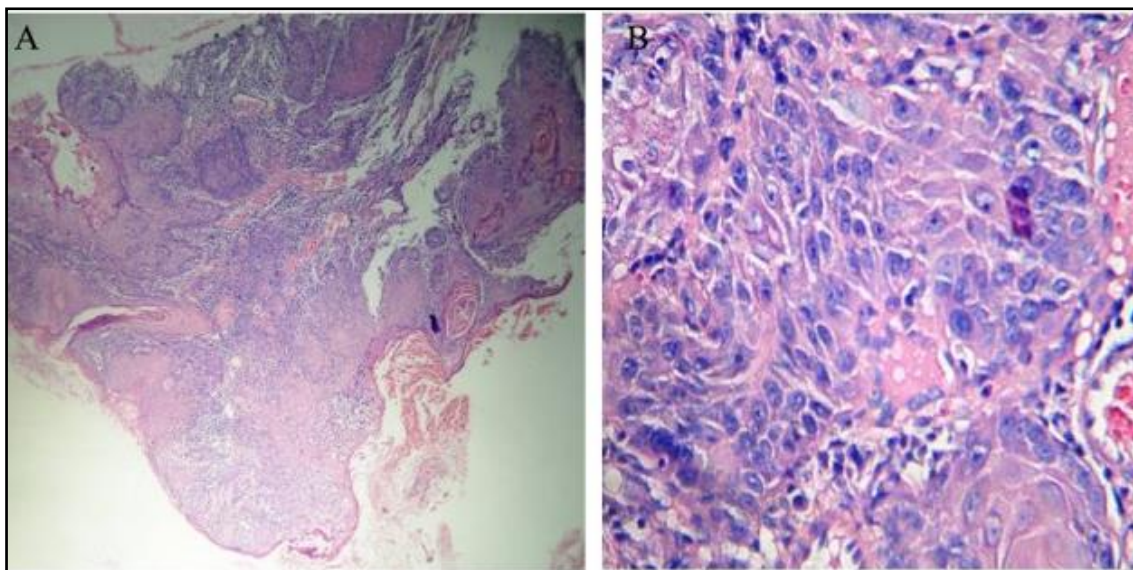
A. Muestra de tinción de Hematoxilina-eosina con aumento de x40. **B.** Aumento x100. Epithelial Dysplasia in Oral Cavity. Samaneh Shirani, 2014.

Ilustración 6. Displasia epitelial severa con presencia de cambios en la capa basal a la capa superior y media del epitelio. Pleomorfismo celular marcado, hipercromatismo nuclear, mitosis atípicas y pérdida de estratificación normal.



A. Muestra en tinción con Hematoxilina-eosina en aumento x100. **B.** Aumento 400x. Epithelial Dysplasia in Oral Cavity. Samaneh Shirani, 2014.

Ilustración 7. Carcinoma in Situ, displasia que involucra desde la capa basal hasta la superficie de la mucosa. Pleomorfismo celular marcado, hiperchromatismo nuclear, mitosis atípicas y pérdida de estratificación normal.



A. Tinción con Hematoxilina-eosina en aumento x40. **B.** Aumento en 100x. Epithelial Dysplasia in Oral Cavity. Samaneh Shirani, 2014.

4.3. Carcinoma oral de Células escamosas

Generalidades

La OMS define al carcinoma oral de células escamosas (COCE) como una neoplasia con diferenciación escamosa proveniente de la mucosa oral. (1)

Presenta una prevalencia alrededor de un 95% de todos los tipos de cáncer oral y durante la década pasada su incidencia aumentó en un 50% (14). Es más común en pacientes de 50 años en adelante y es más común en hombres que en mujeres, esto se debe a hábitos de riesgo o exposición al sol como parte algunas profesiones (15). En Chile, la incidencia poblacional de cáncer en la cavidad oral es 1,3 casos por cada 100.000 habitantes, teniendo en hombres una incidencia de 1,6 casos y en mujeres de 0,8 casos por cada 100.000 habitantes. En cuanto a la mortalidad, en Chile se reporta que en hombres

asciende a 0,8 casos y en mujeres a 0,3 casos por cada 100.000 habitantes. (1)

Su patogénesis es multifactorial y son muchos los factores asociados a su etiología, tales como el tabaco, alcohol, infecciones virales, bacterianas y fúngicas, radiación, genética, inmunosupresión, expresión de oncogenes, desactivación de genes de supresión tumoral y malnutrición. (17)

Un reciente reporte prospectivo confirmó el rol del alcohol y tabaco como factores de riesgo, estimando el riesgo relativo (RR) en 2,74 para los consumidores de más de 30 gr de alcohol por día comparados con abstemios, siendo este RR de 6,39 y para fumadores actuales siendo RR de 2,11 para carcinoma oral. (18)

Criterios de clasificación histopatológica

Según su grado de diferenciación la OMS los clasifica en bien, moderadamente y mal diferenciado. El tipo bien diferenciado se caracteriza por presentar células neoplásicas que se asemejan al epitelio escamoso normal. Las células neoplásicas del tipo moderadamente diferenciado presentan pleomorfismo celular y mitosis atípicas. En el mal diferenciado las células neoplásicas son inmaduras, pleomórficas, con abundantes mitosis atípicas. La presencia de perlas de queratina es más probable encontrarlo en el tipo bien diferenciado. De estas distintas formas, el tipo más frecuente es el moderadamente diferenciado, con una prevalencia aproximada del 90%. (1)

Tabla V. Grado de diferenciación histopatológica del Carcinoma Oral de Células Escamosas(13).

GRADO HISTOPATOLÓGICO		CARACTERÍSTICAS
COCE BIEN DIFERENCIADO (Ilustración 8)		<p>Células tumorales dispuestas en islotes (varían en forma y tamaño) con puentes intercelulares.</p> <p>Células escamosas bien diferenciadas de aspecto poliédrico (núcleos pleomorfos, cromatina heterogénea).</p> <p>Abundantes perlas de queratina (eosinófilas, núcleos picnóticos, cariólisis).</p>
COCE MODERADAMENTE DIFERENCIADO (Ilustración 9)		<p>Células tumorales dispuestas en islotes con puentes intercelulares, separadas en un estroma fibroso, con infiltrado inflamatorio de intensidad variable.</p> <p>Células escamosas atípicas pleomórficas (ovaladas, rectangulares, redondas).</p> <p>Núcleos pleomórficos y anisocariosis.</p> <p>Múltiples mitosis atípicas.</p>
COCE MAL DIFERENCIADO (Ilustración 10)		<p>Células tumorales dispuestas en islotes y/o cordones epiteliales, con pérdida de los puentes intercelulares.</p> <p>Pérdida del fenotipo escamoso.</p> <p>Múltiples mitosis atípicas.</p>

Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO, 2005.

Ilustración 8. COCE bien diferenciado con perlas de queratina. Tinción Hematoxilina-Eosina. Aumento 100x. Matos da Fonseca, 2007.

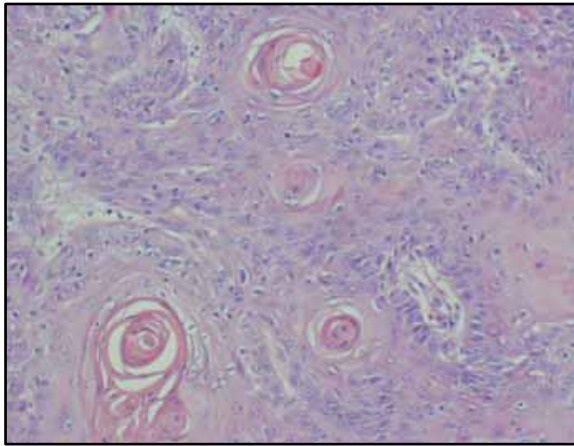


Ilustración 9. COCE moderadamente diferenciado. Tinción Hematoxilina-Eosina. Aumento 100x. Horikawa Satto L., 2012.

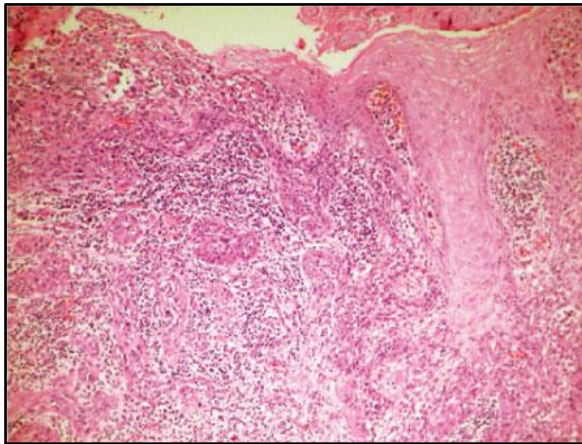
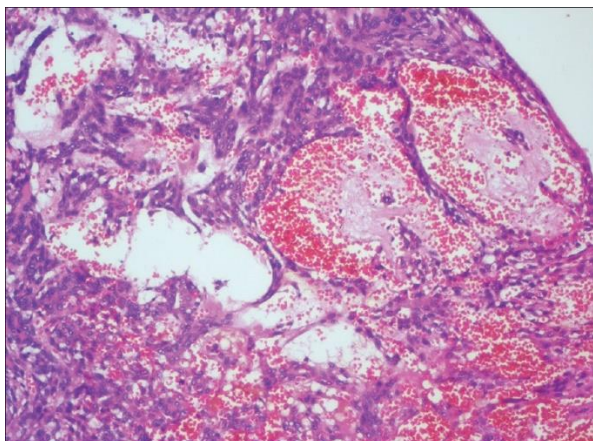


Ilustración 10. COCE mal diferenciado. Invasión vascular por células tumorales. Tinción Hematoxilina-Eosina. Aumento 100x. Sudhakara M., 2016.



4.4. Fibrosis

El término fibrosis hace relación al depósito excesivo de colágeno y otros componentes de la MEC en un tejido. Los mecanismos básicos asociados al desarrollo de fibrosis en las enfermedades inflamatorias crónicas son similares, en general, a los mecanismos de cicatrización de las heridas cutáneas y su posterior reparación. La inflamación crónica se caracteriza por la proliferación y activación de linfocitos y macrófagos, y la producción de abundantes factores de crecimiento inflamatorios y fibrogénicos y citocinas. (19)

Los Linfocitos y macrófagos juegan un papel esencial en la regulación de la fibrosis mediante la liberación de mediadores que modulan el tipo de fibroblasto y el metabolismo de la matriz. De esto podemos desprender que esta regulación, favorece la aparición de miofibroblastos, el principal productor de fibras colágenas. (20)

Luego de la permanencia del proceso inflamatorio y la activación de macrófagos y linfocitos, existen dos vías medidas por citoquinas para la producción de la fibrosis: (19)

1. Factores de crecimiento (PDGF, FGF, TGF- β), que inducen la diferenciación y proliferación de fibroblastos.
2. Factores de crecimiento (PDGF, FGF, TGF- β), que aumentan la síntesis de colágeno.

3. Reducción de la actividad de metaloproteinasas, que disminuye la degradación del colágeno.

La principal citoquina involucrada en el proceso de la fibrosis es sin lugar a dudas el TGF- β . El TGF- β induce la diferenciación del fibroblasto a miofibroblasto, promueve la preservación y el depósito de colágeno, a través del mejoramiento de la síntesis proteica y alteración del balance entre la preservación y la degradación de la MEC. Además, el TGF- β , presenta el potencial de estimular la transcripción genética del colágeno tipo 1, aumentando así la cantidad de fibras en la MEC y, por otro lado, está implicado en la modificación del colágeno, debido al incremento de la estabilidad de este (21). Estos fibroblastos son altamente numerosos en el microambiente

4.5. Fibroblastos asociados a cáncer

Los cambios genéticos que ocurren en las células epiteliales tumorales son un factor importante como promotor del cáncer. Sin embargo, se ha observado que las células que podemos encontrar en el estroma tumoral como fibroblastos, células inmunes y endoteliales también presentan una participación activa en el crecimiento tumoral y metástasis.

Tal como ocurre con las células inmunes que en un comienzo suprimen el crecimiento maligno, los fibroblastos también inhiben en etapas tempranas la progresión tumoral del cáncer a través uniones gap que forman entre fibroblastos activados. Más tarde, cuando aumenta la progresión del cáncer los fibroblastos asociados al cáncer (CAF's) promueven el crecimiento tumoral y su progresión. (6)

Los CAF's transmiten señales a través de mecanotransductores, proceso mediante el cual los fibroblastos activados convierten la estimulación física en señales químicas que conducen en la activación de las vías de señalización del cáncer. (22) El endurecimiento estromal o conectivo inducido por el tumor es provocado por un aumento en los depósitos de matriz causado por CAFs,

reticulación y agrupación, combinado con la alta presión intersticial causada por la masa tumoral en expansión. (23)

Está bien establecido que los fibroblastos activados promueven el crecimiento de células tumorales y aumentan la angiogénesis, invasión y metástasis. (24, 25, 26). Evidencias de estudios más directos han revelado la importancia pronóstica de los CAFs en varios tipos de carcinomas como cáncer mamario, pancreático, prostático y colo-rectal. (27)

Los CAF's son responsables de la producción de factores de crecimiento paracrino, enzimas proteolíticas y componentes de la matriz extracelular (ECM) (30) Los fibroblastos del estroma también responden al epitelio neoplásico al expresar niveles elevados de colágeno, factores de crecimiento y factores desmoplásticos. (6)

Lewis et al. (29) Estudiaron líneas celulares in vitro de COCE y fibroblastos orales primarios normales y verificó que las células neoplásicas - a través de la secreción de TGF- β 1 - pueden inducir la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos. Los autores también observaron que los miofibroblastos secretaban mayores cantidades de HGF cuando se comparaban con fibroblastos primarios, y que el HGF promovía la invasión de células de cáncer oral en una matriz de Matrigel. Según los autores, estos hallazgos implican la existencia de un mecanismo paracrino doble entre las células cancerosas orales y los miofibroblastos.

Kellermann et al. (30) Utilizaron un modelo experimental similar al empleado por Lewis et al. (30), encontraron que las células de cáncer oral presentaban una participación importante en el proceso de diferenciación de fibroblastos primarios normales en miofibroblastos a través de la secreción de TGF β 1. De acuerdo con Kellermann et al. (30), los resultados reportados en su estudio revelaron la existencia de efectos paracrinós mutuos entre las células cancerosas orales y los fibroblastos orales normales, caracterizados por el desencadenamiento de la transdiferenciación de estos últimos en

miofibroblastos y la modulación en la proliferación de células neoplásicas malignas.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1. Tipo de Estudio

La investigación corresponde a un estudio Descriptivo del tipo Serie de casos, el cual cuenta con la aprobación del Comité Ético Científico de la Universidad Andrés Bello, sede República (Anexo 1)

5.2. Muestra

La muestra del estudio consiste en un N muestral de 55 tacos embebidos en parafina, que fueron facilitadas para este estudio por el servicio de histopatología de la Universidad Andrés Bello, Viña del Mar (Anexo 2). Fueron 46 muestras las seleccionadas, según criterios de inclusión y exclusión. Las muestras fueron procesadas en el servicio de histopatología, entre los años 2004 y 2012. De los cuales 15 muestras corresponden al diagnóstico de DEO, 13 a COCE y 18 a MON como grupo de control.

Un patólogo oral evaluó previamente todas las muestras con tinción de hematoxilina eosina para corroborar los diagnósticos de MON, DEO y COCE, basándose en lo reportado por la OMS (2005).

Población y muestra

Población: Pacientes que asisten al centro odontológico UNAB Santiago y Viña del Mar

Muestra de estudio: muestras compatibles con los diagnósticos de MON, DEO y COCE obtenidas del servicio de histopatología la Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, entre los años 2004 y 2012.

- Criterios de inclusión:

Se considerarán como criterios de inclusión los casos que contaban con registros relativos a la edad, género del paciente y localización de la lesión.

- Criterios de exclusión:

Se excluirán las muestras con información relativa de COCE por recidiva o metástasis en la mucosa oral, individuos tratados con inmunosupresores y muestras histológicas con artefactos de técnica.

5.3 Variables

Tabla VI. Tabla de Variables.

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Descripción
Edad	Años del paciente en que se extrajo la muestra	Cuantitativa, discreta	Obtenida del registro de ficha de la Universidad Andrés Bello.
Género	Femenino, masculino	Cualitativa, dicotómica	Obtenida del registro de ficha de la Universidad Andrés Bello.
Diagnóstico	Mucosa normal, displasia epitelial oral, carcinoma espinocelular	Cualitativa, tricotómica	Realizado por un patólogo oral experto, basado en ^{10,1} .
Localización	Bajo riesgo, alto riesgo	Cualitativa, dicotómica, nominal	Clasificación 3. alto riesgo: Mucosa del borde lateral y vientre de la lengua y

			<p>piso de boca.</p> <p>Bajo riesgo: mucosa labial, yugal, palatina, alveolar, dorso lingual y encía.</p>
Extensión de fibrosis intersticial	0, +1,+2,+3,+4	Cualitativa, ordinal	<p>0: No hay presencia de fibrosis.</p> <p>+1: 1-25% de fibrosis del total de la imagen.</p> <p>+2: 26-50% de fibrosis del total de la imagen.</p> <p>+3: 51-75% de fibrosis del total de la imagen.</p> <p>+4: 76-100% de fibrosis del total de la imagen.</p>

5.4. Técnica de Tinción Tricrómica de Masson

De 55 muestras previamente incluidas en parafina, se seleccionaron 46 muestras según los criterios de inclusión. Se obtuvieron cortes de 4 micrones los cuales se desparafinaron e hidrataron en agua destilada. Primero se fijó en solución de formaldehído y luego se realizó un montaje con líquido de Bouin durante 1 hora a 56-60 °C. Luego se enfrió y lavo en agua destilada para quitar el color amarillo. Se realizó un teñido con hematoxilina férrica durante 10 minutos y se lavó en agua destilada durante 10 minutos. Luego se realizó teñido con la solución de escarlata-fucsina ácida durante 2-5 minutos y se lavó con agua destilada. A continuación, se trató con la solución de ácido fosfomolibdicofosfotúngstico durante 10-15 minutos y luego se realizó el teñido con solución de azul de anilina 15 minutos. Se lavó en agua destilada y se deshidrató, aclaró y montó en portaobjeto.

Con esta técnica se busca diferenciar distintas estructuras en un mismo tejido. El tejido conjuntivo se teñirá de tonalidades de azul, la queratina, los glóbulos rojos y el tejido muscular se teñirán de rojo y los núcleos se teñirán Lila o Marrón.

5.5. Calibración

La calibración y entrenamiento del examinador estuvo a cargo de un experimentado patólogo oral y abarcó tanto un área teórica (revisión bibliográfica) como práctica. El área teórica consistió en observar y analizar microfotografías de MON, DEO y COCE teñidos con Tricrómica de Masson, de publicaciones referentes al tema.

En el área práctica se determinó el grado de acuerdo o concordancia entre el examinador y un “Gold Standard” (Observador A.F) en dos ocasiones utilizando el índice estadístico de kappa. En cada oportunidad se mostraron múltiples microfotografías y el examinador debía detectar la presencia o en su defecto la ausencia de inmunotinción. En la primera sesión, de las 30 microfotografías mostradas se obtuvieron 22 aciertos, por lo que el acuerdo entre el observador y el gold standard fue moderado ($0.45 <$). En la segunda sesión, se obtuvieron 28 aciertos de un total de 30 microfotografías, por lo que el acuerdo interobservador fue considerado bueno (<0.75)

5.6 Determinación de la fibrosis intersticial

Para el análisis de todas las muestras obtenidas, las secciones fueron observadas en su totalidad por un patólogo oral (Dra. A. F) junto con los dos investigadores ejecutores (L.Y.) y (C.P.) bajo un microscopio óptico (Zeiss® Primo StarTrinocular), con un aumento de 100x total, con el fin de identificar las áreas de mayor fibrosis bajo el epitelio oral normal, displásico y neoplásico maligno. Una vez identificadas las áreas de interés, se cambia el objetivo a un aumento de 400x total y se registran 3 imágenes fotográficas de manera consecutivas, utilizando una cámara digital Canon t3i de 18,0 megapíxeles la que se encuentra incorporada al microscopio óptico. Una vez tomadas las fotografías, cada imagen fueron abiertas en el software Micrometrics (Premium

versión 2.9), donde se insertó una tabla de 6x6, formando 36 cuadrantes de 0.34mm² cada uno. Para determinar la fibrosis intersticial, un patólogo oral A.F., tutora asociado C.S junto con 2 investigadores L.Y. y C.P. asignaron un porcentaje a la cantidad de fibrosis que se observó en la imagen. Se consideraron como fibras colágenas, las regiones teñidas en color verde-azulado con tinción Tricrómica de Masson y se clasificó de acuerdo a la siguiente tabla.

Clasificación de la extensión de fibrosis intersticial:

- 0: No hay presencia de fibrosis.
- +1: 1-25% de fibrosis del total de la imagen.
- +2: 26-50% de fibrosis del total de la imagen.
- +3: 51-75% de fibrosis del total de la imagen.
- +4: 76-100% de fibrosis del total de la imagen.

5.7. Análisis estadístico

La edad se representó mediante mediana y rango intercuartílico (RIC). Las variables cualitativas (sexo, localización, extensión de fibrosis intersticial) se representaron mediante frecuencia absoluta y relativa. El análisis de dos variables categóricas se realizó mediante el test exacto de Fisher. El análisis de la edad y extensión de la fibrosis según diagnóstico se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis y para evaluar las diferencias en los rangos, se utilizó el test post hoc de Conover -Iman. Se utilizó un nivel de significancia de un 0,05 y se realizó el análisis estadístico con el programa STATA 12® (StataCorp LP, Texas, USA)

6. RESULTADOS

6.1.Descripción de las muestras

El número de muestras incluidas, la distribución por edad y género, considerando los diagnósticos MON, DEO y COCE y la totalidad de las muestras, se observan en la tabla 7.

Tabla VII. Descripción de las muestras.

	MON	DEO	COCE	Muestra total
Número de muestras	18	15	13	46
Mediana edad (años)	21	56	75	48,1
Rango intercuartílico(años)	9 a 36	37 a 86	60 a 94	21,6 a 75,4

Al comparar la mediana de la edad según promedio, al menos una difirió del resto (ANOVA $p < 0,001$) y ninguno de los 3 grupos de diagnóstico presentó la misma mediana ($p < 0,00$). No se encontró asociación estadísticamente significativa entre el género y diagnóstico ($p = 0,483$). Al realizar la comparación entre la localización y diagnóstico, considerando solo los diagnósticos de DEO y COCE ya que no es aplicable para MON, tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa ($p = 0,114$).

Al evaluar la extensión de fibrosis según diagnóstico (Tabla 8) se encontró asociación estadísticamente significativa entre los diagnósticos (MON, DEO y COCE) y la extensión de fibrosis intersticial ($p < 0,001$). La extensión de al menos uno de los 3 grupos de diagnóstico difirió del resto ($p < 0,001$). El grupo con diagnóstico de MON difiere en la extensión de fibrosis intersticial del grupo con diagnóstico de COCE ($p < 0,001$) y el grupo con diagnóstico de DEO difiere en la extensión de fibrosis intersticial con el grupo con diagnóstico de COCE

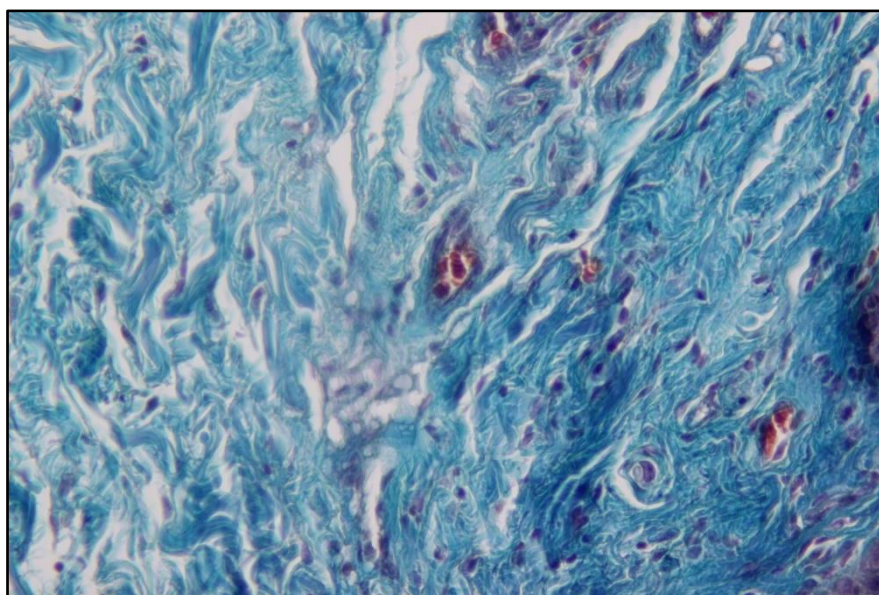
($p < 0.001$). El grupo con diagnóstico de MON no difirió del grupo con diagnóstico de DEO ($p = 0.371$).

Tabla VIII. Comparación de la extensión de fibrosis intersticial en muestras de MON, DEO y COCE.

	Extensión									
	0		1		2		3		4	
	0%		1-25%		26-50%		51-75%		76-100%	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
MON	11	61,1	6	33,3	0	-	1	5,56	-	-
DEO	11	73,3	2	13,3	1	6,67	-	-	1	6,67
COCE	-	-	4	30,7	6	45,15	2	15,38	1	7,69

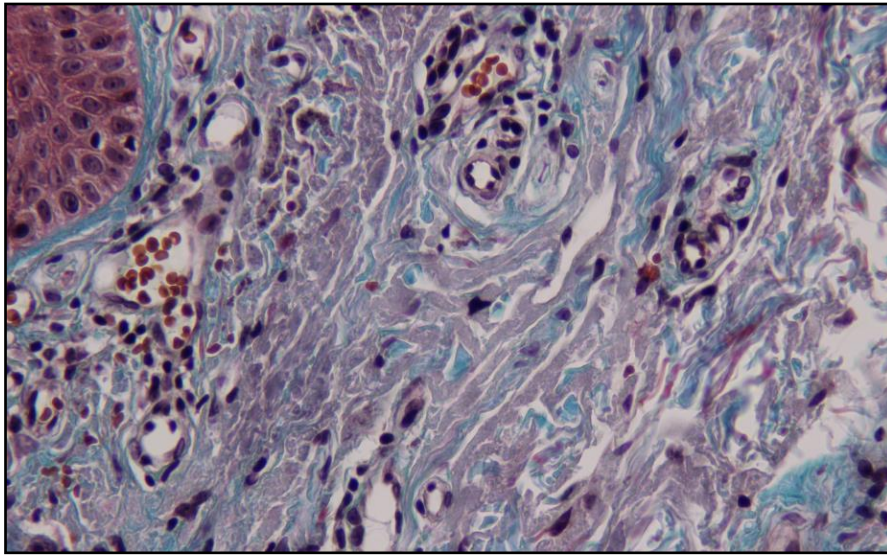
6. 2. Ilustraciones

Ilustración 11. Se observa muestra de Mucosa oral normal con extensión +1 Fibrosis intersticial. Aumento 100x, Tinción Tricrómico de Masson.



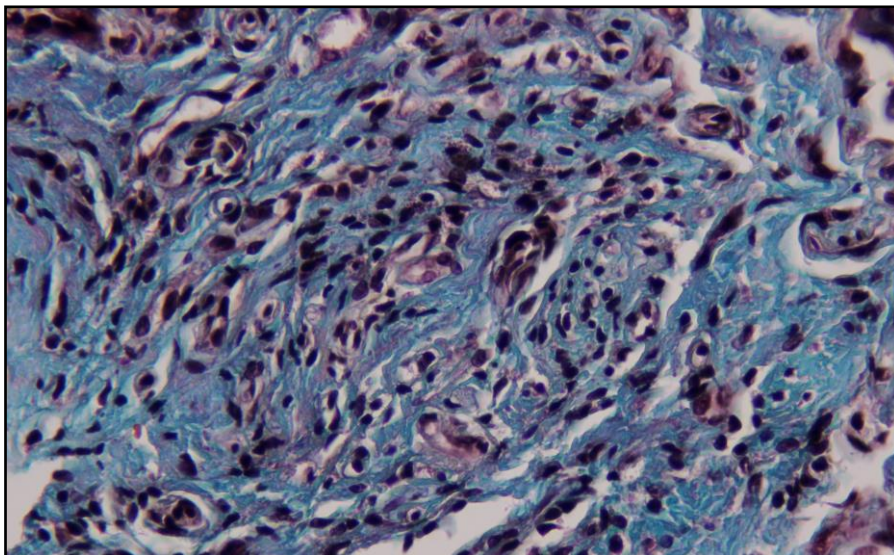
Servicio de histopatología, Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello.

Ilustración 12. Se observa muestra de Displasia epitelial leve con extensión +4 de Fibrosis intersticial. Aumento 100x, Tinción Tricrómico de Masson.



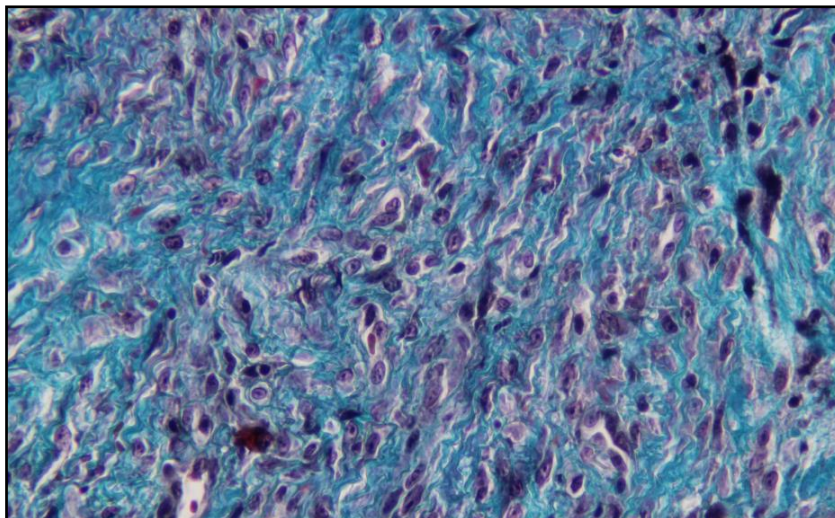
Servicio de histopatología, Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello.

Ilustración 13. Se observa muestra de Carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado con extensión +2 de Fibrosis intersticial. Aumento 100x, Tricrómico de Masson.



Servicio de histopatología, Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello.

Ilustración 14. Se observa muestra de Carcinoma oral de células escamosas moderadamente diferenciado con extensión+2 de Fibrosis intersticial. Aumento 100x, Tricrómico de Masson.



Servicio de histopatología, Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio caracterizamos la extensión de la fibrosis intersticial en muestras histopatológicas con diagnóstico de mucosa oral normal (MON), displasia epitelial oral (DEO) y carcinoma oral de células escamosas (COCE) mediante el uso de la tinción Tricrómico de Masson.

El diagnóstico histopatológico para el grupo con DEO y con COCE fue realizado principalmente cuando los individuos afectados eran mayores de 50 años. Sin embargo, el grupo diagnosticado de DEO (media 56 años) antecedió al grupo diagnosticado de COCE (media 75 años). Estos resultados son concordantes con lo reportado en la literatura nacional e internacional.(1,14)

En nuestro estudio no se encontró diferencia por género según diagnóstico de DEO y COCE ($p=0,483$), lo que coincide con lo reportado por Fitzpatrick *et al.* (33) y Warnakulasuriya *et al.* (34). Sin embargo, Martínez *et al.* (2) encontraron que en Chile los afectados por DEO es mayor en el sexo femenino y que los afectados por COCE es mayor en el sexo masculino. Estas diferencias podrían deberse a la baja información epidemiológica sobre individuos diagnosticados de DEO y COCE en Chile (16).

La ubicación más frecuente de DEO y COCE son la lengua y piso de boca, conocidas como áreas de alto riesgo, debido a que son zonas cubiertas por un epitelio delgado no queratinizado donde quedan expuestos directamente a los agentes carcinogénicos como el tabaco y alcohol (1,18,19). Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos diferencia en la ubicación de DEO y COCE en zonas de alto y bajo riesgo, lo que coincide con lo publicado por Santelices Ch. *et al.* (36) y Riera y Martínez (35). Este resultado se podría atribuir a que las DEO y COCE ya no sólo se asocian a tabaco y alcohol, sino que también podrían estar fuertemente involucrados factores genéticos, inmunológicos y dietéticos, entre otros (20).

En el presente estudio, observamos diferencia significativa en la extensión de fibrosis intersticial en COCE al compararla con MON y DEO. Sin embargo, esta diferencia no existió en la extensión de fibrosis intersticial entre MON y DEO, lo que coincide con lo reportado por *Mei Lao et al.*(39). Este resultado se puede atribuir a que la activación de los fibroblastos de manera irreversible, metabólicamente activos para sintetizar colágeno es en la etapa de COCE y no en etapas previas como es MON o DEO (39,28). Además, es importante señalar que los fibroblastos activados de forma irreversible en cáncer presentan funciones claves para el crecimiento y metástasis tumoral (28). Entre estas funciones destaca la regulación de metaloproteinasas, angiogénesis, linfogénesis y sistema inmune (40, 28).

El estudio presenta limitación del número de casos incluidos, debido a la baja prevalencia de DEO y COCE(2, 42).

8. CONCLUSIONES

La fibrosis intersticial se presenta en las muestras de MON, DEO y COCE, presentando una mayor extensión a mayor malignidad del diagnóstico. La fibrosis intersticial puede ser considerado un marcador de COCE, pero no de DEO.

Este estudio no presenta conflicto de intereses.

9. REFERENCIAS

1. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO, 2017
2. Martínez C., Hernández M., Martínez B., Adorno D. Frecuencia de displasia epitelial y carcinoma escamoso en mucosa oral y orofaríngea en Chile, entre los años 1990 y 2009. Rev. méd. Chile, 2016; 144 (2).
3. Guzmán P., Villaseca M., Antonio L., Araya J., et al. Carcinoma epidermoide oral y orofaríngeo. Estudio clínico-patológico. RevChilCir 2011; 63 (3): 250-6.
4. Sidrón MC., Somacarrera ML. Cáncer oral: genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. Revisión de la literatura. AvOdontoestomatol [Internet]. 2015 jul-ago [citado 2 Mar 2015];31(4). Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852015004400002
5. George J., Narang RS., Rao NN. "Stromal response in different histological grades of oral squamous cell carcinoma: A histochemical study". IJDR, 2012; 23 (6); 842.
6. Tripathi M., Sandrine B., Bhowmick N. Understanding the role of stromal fibroblasts in cancer progression. Special focus review. Cell Adhesion & Migration. 2012; 6(3): 231–235.
7. Xiao-Mei L., Yu-Jie L., Yu-Xiong S., Si-En Z. and Gui-Qing L. Distribution and significance of interstitial fibrosis and stroma-infiltrating B cells in tongue squamous cell carcinoma. Oncology Letters, 2016; 11: 2027-203.
8. Díaz-Peña R., Castro-Santos P. Histological changes implicated in metastasis. Int. J. Morphol., 32(3):935-941, 2014.
9. Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, et. al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. Cancer Res. 2010;70 (17): 6945–6956.
10. Ten Cate's. Oral Histology: Development, structure and function. 8th Edition.
11. María Elsa Gomez de Ferraris, Campos Muñoz. Histología y embriología bucodental, Edición 3°, 2009.
12. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO, 2005.
13. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. Oral surgery oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 1995 Mar;79(3):321-9.

14. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex, and anatomic site. *Oral Oncol* 2014;50(5):387-403.
15. Lingen MW, Kalmarr JR, Karrison T, Serbit PM. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncol* 2008;44(1): 10-22.
16. Cardemil F. Epidemiología del Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello. *Rev Chil Cir.* 2014 ;66 (6): 614-620.
17. Mortazavi H, Baharvand M, Mehdipour M. Oral potentially malignant disorders: an overview of more than 20 entities. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2014 ;8(1):6-14.
18. Maasland DH, van den Brandt PA, Kremer B, Goldbohm RA, Schouten LJ. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer* 2014;14:187.
19. Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional.* 2010.
20. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, et al. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170:1807–1816.
21. Biernacka A., Dobaczewski M., Frangogiannis N. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors.* 2011 October; 29(5): 196–202
22. Chiquet M., Gelman L., Lutz R., Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 911–920.
23. Kumar S., Weaver S.M. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell, *Cancer Metastasis Rev.* 28(2009) 113–127.
24. Erez N., Truitt M., Olson P., Hanahan D. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner. *Cancer Cell* 17 (2010) 135–147.
25. De Wever O., Demetter P., Mareel M., Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth, *Int. J. Cancer* 123 (2008) 2229–2238.
26. Nyberg P., Salo T., Kalluri R. Tumor microenvironment and angiogenesis, *Front. Biosci.* 13 (2008) 6537–6553.
27. A. Östman, M. Augsten, Cancer-associated fibroblasts and tumor growth — bystanders turning into key players, *Curr Opin Genet Dev.* 19 (2009) 97-73.
28. Kalluri R., Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:392-401
29. Lewis MP., Lygoe KA., Nystrom ML., Anderson WP., Speight PM, et al. Tumour-derived TGF- β 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes

HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *Br J Cancer*. 2004;90(4):822-32.

30. Kellermann MG., Sobral LM., da Silva SD., Zecchin KG, Graner E., et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncol*. 2008;44(5):509-17

31. Pereira JS., Carvalho MV., Henriques AC., de Queiroz Camara TH., Miguel MC., et al. Epidemiology and correlation of the clinicopathological features in oral epithelial dysplasia: analysis of 173 cases. *Ann Diagn Pathol* 2011; 15 (2): 98-102.

32. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52 (4): 195-215.

33. Fitzpatrick S., Honda K., Sattar A., Hirsch S. Histologic lichenoid features in oral dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014;117(4):511-20.

34. Warnakulasuriya S., Kovacevic T., Madden P., Coupland VH., Sperandio M., et al. Factors predicting malignant transformation in oral potentially malignant disorders among patients accrued over a 10-year period in South East England. *J Oral Pathol Med* 2011 Oct;40(9):677-83.

35. Riera P., Martínez R. Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile. *Rev Med Chile* 2005; 133: 55-63.

36. Santelices MJ., Cárcamo M., Brener C., et al. Cáncer oral en Chile. Revisión de la literatura. *Rev Med Chile*. 2016 jun ;144(6):1-6.

37. Ribeiro D., Gleber F., Ferreira S., Bernardes V., Nogueira M., Ferreira M. Immunohistochemical expression of EGFR in oral leokoplasia: Association with clinicopathological features and celular proliferation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012, 1: 739-744.

38. Wang YY., Tail YH., Wang WC., Chen CY., Kao YH., et al. Malignant transformation in 5071 southern Taiwanese patients with potentially malignant oral mucosal disorders. *BMC Oral Health* 2014;14:99.

39. Xiao-Mei L., Yu-Jie L., Yu-Xiong S., Si-En Z. and Gui-Qing L. Distribution and significance of interstitial fibrosis and stroma-infiltrating B cells in tongue squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 2016; 11: 2027-203.

40. Nan-Nan L., Ping W., Dan Z., Fu-Jun Z., Kai Y., y Rui C. Significance of oral cancer-associated fibroblasts in angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2017; 46: 21–3

41. Zhao D., Pan J., Li XQ., Wang XY., Tang C., et al. Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37: 616–25.

42. Fernández A, Córdova P, Badenier O, Esguep A. Epidemiological characterization of oral cancer. Literature review. J Oral Res. 2015;4(2):147-154.

10. ANEXO

Anexo 1: Carta de información para el comité ético-científico UNAB y certificado de aprobación.



Santiago, 16 de Abril del 2017

Información para el comité de Bioética

El propósito del estudio es confeccionar un proyecto de tesis para optar por el título de cirujano dentista, por parte de alumnos internos de sexto año de la carrera de odontología, los cuales son investigadores a ejecutores, con el título de “ANÁLISIS DE FIBROSIS INSTERTICIAL EN MUCOSA ORAL NORMAL, DISPLASIA EPITELIAL ORAL Y CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS” Nuestro tutor encargado es la Dra. Alejandra Fernández Moraga, Magíster en Odontología con Especialización en Patología, Diagnóstico y Medicina Oral.

El estudio tiene por objetivo analizar la fibrosis intersticial en muestras de Mucosa Oral Normal (MON), Displasia Epitelial Oral (DEO) y Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) con tinción de Tricrómico de Masson (TM), determinando la extensión de ella según diagnóstico obtenido de la mucosa oral. Con esto se quiere encontrar diferencias en fibrosis de los diferentes estadios patológicos entre Mucosa oral normal, Displasia epitelial oral y Carcinoma Oral de células Escamosas utilizando la técnica de tinción con Tricrómica de Masson.

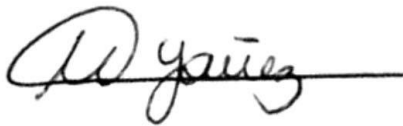
Las implicancias éticas de este estudio se guiarán según lo que fué descrito en la declaración de Helsinki (65), en la cual se establecen los principios éticos que orientan a los investigadores que realizan estudios en seres humanos. Cada persona interesada en participar en el estudio fue informada de sus derechos.

Para llevar a cabo el estudio necesitamos las muestras que serán obtenidas del Servicio Histopatológico de la Universidad Andrés Bello sede Viña del Mar, las cuales corresponden 52 muestras fijadas con formaldehído en tacos embebidos en parafina obtenidos entre los años 2004 y 2012. Lo anterior corresponde a 16 muestras con diagnóstico de displasia epitelial oral, 17 de

carcinoma oral de células escamosas y 19 de mucosa oral normal como grupo de control. Las muestras fueron tomadas con sus respectivos consentimientos informados de los voluntarios, las que quedaron a cargo del jefe del laboratorio del Servicio Histopatológico de la Universidad Andrés Bello sede Viña, además se nos hará entrega, solamente, los datos respecto al género y edad, por lo cual cada muestra será registrada con un código sin información de identidad.

Para utilizar las muestras correspondientes, luego de ser procesadas con tinción Tricómica de Masson, solo serán fotografiadas con fines de comunicaciones científicas y biomédicas. Además nos comprometemos que las muestras nos serán utilizadas con otros fines y se resguardará la información de género y edad de manera confidencial.

Sin otro particular se despiden atentamente,



Lilaj Yañez Lagos y Claudio Peralta Rivera
Licenciados en Odontología
Internos de 6° año UNAB

Santiago, 26 de Enero, 2017

CERTIFICADO

El Comité Ético Científico de la Escuela de Odontología de la Universidad Andrés Bello, sede Santiago, certifica que el proyecto investigación **"análisis de la fibrosis intersticial en mucosa oral normal, displasia epitelial oral y carcinoma oral de células escamosas"**, de la Dra. Alejandra Fernández, ha sido **Aprobado** después de una revisión exhaustiva y de las observaciones planteadas por este Comité, comentadas en sesiones plenarias las cuales fueron debidamente aclaradas o implementadas según lo informado por los investigadores.

En virtud de lo anterior, en este acuerdo se estableció de forma unánime la implementación de la investigación. Sin desmedro de lo anterior, cualquier cambio posterior en el transcurso del estudio deberá ser informado formalmente a este Comité para su re-evaluación y nueva aprobación.

Observaciones:



Comité Ético Científico
Universidad Andrés Bello
Campus República
FACULTAD DE OD

Anexo 2: Carta de autorización Servicio de Histopatología UNAB



Santiago, 10 de Abril del 2017

Autorización para utilizar banco de muestras de servicio de Histopatología, Viña del Mar UNAB para proyecto de investigación “ANÁLISIS DE FIBROSIS INSTERTICIAL EN MUCOSA ORAL NORMAL, DISPLASIA EPITELIAL ORAL Y CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS”.

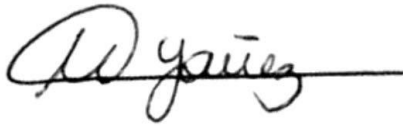
Estimado René Martínez, Director de Servicio de Histopatología, Sede Viña del Mar.

Junto con saludarlo me dirijo a Ud. Para solicitar su colaboración en el proyecto de tesis para optar al título de Cirujano Dentista “es ANÁLISIS DE FIBROSIS INSTERTICIAL EN MUCOSA ORAL NORMAL, DISPLASIA EPITELIAL ORAL Y CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS” de los Licenciados en Odontología Claudio Peralta Rivera y Lilaj Yáñez Lagos., el cual tiene por objetivo Analizar la fibrosis intersticial en muestras de Mucosa Oral Normal (MON), Displasia Epitelial Oral (DEO) y Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) con tinción de Tricrómico de Masson (TM).

Esta investigación operativamente consiste en usar las muestras en tacos de parafina del Servicio de Histopatología, con los diagnósticos de Mucosa oral Normal, Displasia epitelial oral y Carcinoma oral de Células escamosas, solicitando solo los datos de edad y género. Estas muestras serán procesadas para tinción en Tricrómico de Masson. Nuestro tutor encargado es la Dra. Alejandra Fernández Moraga.

Junto con lo anteriormente explicado deseamos solicitar el acceso para utilizar las muestras correspondientes, comprometiéndonos que nuestra investigación no presentará riesgo alguno para las muestras.

Sin otro particular se despiden atentamente.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "C. Peralta", with a horizontal line extending to the right.A stylized, cursive handwritten signature in black ink, enclosed within a large, horizontal oval loop.

Claudio Peralta Rivera y Lilaj Yáñez Lagos.
Licenciados en Odontología
Internos de 6to año de Odontología

A handwritten signature in purple ink, consisting of a series of loops and a final upward stroke.

Dr. René Martínez